



TITLE:

アルツハイマー病因ペプチドの凝集機構の解明と凝集阻害剤の開発

AUTHOR(S):

入江, 一浩

CITATION:

入江, 一浩. アルツハイマー病因ペプチドの凝集機構の解明と凝集阻害剤の開発. 2004

ISSUE DATE:

2004-03

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/85072>

RIGHT:

p13-23は学術雑誌掲載論文の抜き刷り、出版社に著作権許諾が得られていないため未掲載。

アルツハイマー病因ペプチドの凝集機構の解明と 凝集阻害剤の開発

(研究課題番号 13460048)

平成13年度～平成15年度科学研究費補助金 [基盤研究(B)(1)]
研究成果報告書

京 都 大 学 図 書



1040940638

附 属 図 書 館

平成 16 年 3 月

研究代表者 入 江 一 浩

(京都大学農学研究科助教授)

科研

003

56

アルツハイマー病因ペプチドの凝集機構の解明と 凝集阻害剤の開発

(研究課題番号 13460048)

平成13年度～平成15年度科学研究費補助金 [基盤研究(B)(1)]
研究成果報告書

平成 16 年 3 月

研究代表者 入 江 一 浩

(京都大学農学研究科助教授)

は し が き

本研究は、京都大学大学院農学研究科 食品生物科学専攻 生命有機化学分野（大東 肇 教授）において行われたものです。本研究室において実験に携わっていただいた森本 晃、村上一馬、増田裕一 各氏に心より感謝の意を表します。また、ペプチド合成および質量分析でご協力いただきましたアプライドバイオシステムズジャパン（株）の福田宏之 博士および進藤真由美 博士、細胞培養法をご指導いただきました京都大学生命科学研究科 統合生命科学専攻 生体情報応答学分野の永尾雅哉 教授、FT-IR スペクトルの測定に関してご指導いただいたジャスコエンジニアリング（株）の閑林直人 氏および赤尾賢一 氏、研究を進めていく上で多くのご助言をいただきました東京都老人総合研究所分子老化部門 白澤卓二 室長および京都大学大学院理学研究科 化学専攻 分子構造化学分野の竹腰清乃理 助教授に厚く御礼申し上げます。

研究組織

研究代表者： 入江 一浩 （京都大学農学研究科助教授）

研究分担者： 清水 孝彦 （東京都老人総合研究所研究員）

交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 13 年度	7,600	0	7,600
平成 14 年度	3,800	0	3,800
平成 15 年度	3,700	0	3,700
総 計	15,100	0	15,100

研究発表

(1) 学会誌 (原著論文)

1. K. Murakami, K. Irie, A. Morimoto, H. Ohigashi, M. Shindo, M. Nagao, T. Shimizu, and T. Shirasawa: Synthesis, aggregation, neurotoxicity, and secondary structure of various A β 1-42 mutants of familial Alzheimer's disease at positions 21-23. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **294** (1), 5-10 (2002).
2. A. Morimoto, K. Irie, K. Murakami, H. Ohigashi, M. Shindo, M. Nagao, T. Shimizu, and T. Shirasawa: Aggregation and neurotoxicity of mutant amyloid β (A β) peptides with proline replacement: importance of turn formation at positions 22 and 23. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **295** (2), 306-311 (2002).
3. K. Murakami, K. Irie, A. Morimoto, H. Ohigashi, M. Shindo, M. Nagao, T. Shimizu, and T. Shirasawa: Neurotoxicity and physicochemical properties of A β mutant peptides from cerebral amyloid angiopathy. *J. Biol. Chem.*, **278** (46), 46179-46187 (2003).

(2) 口頭発表

1. 村上一馬、入江一浩、森本 晃、大東 肇、永尾雅哉、清水孝彦、白澤卓二：家族性アルツハイマー β ペプチドの合成、凝集活性および神経細胞毒性。日本農芸化学会 2002 年度大会（仙台）2002 年 3 月。
2. 森本 晃、村上一馬、入江一浩、大東 肇、永尾雅哉、清水孝彦、白澤卓二：アルツハイマー β ペプチドのプロリン置換誘導体によるアミロイド生成機構の解析。日本農芸化学会 2002 年度大会（仙台）2002 年 3 月。
3. 村上一馬、入江一浩、森本 晃、大東 肇、進藤真由美、永尾雅哉、清水孝彦、白澤卓二：家族性アルツハイマー病因ペプチドの化学合成、凝集活性および神経細胞毒性。第 37 回天然物化学談話会（京都）2002 年 7 月。
4. Kazuma Murakami, Kazuhiro Irie, Akira Morimoto, Hajime Ohigashi, Mayumi Shindo, Masaya Nagao, Takahiko Shimizu, and Takuji Shirasawa: Synthesis, aggregation, neurotoxicity, and secondary structure of various A β 1-40 and A β 1-42 mutants of familial Alzheimer's disease at positions 21-23. 1st Japan-Korea Young Scientists Meeting on

5. 村上一馬、入江一浩、森本 晃、大東 肇、永尾雅哉、清水孝彦、白澤卓二：家族性アルツハイマー病因 β アミロイドの凝集活性および神経細胞毒性. 日本農芸化学会 2003 年度大会（東京）2003 年 4 月.
6. 森本 晃、入江一浩、村上一馬、大東 肇、永尾雅哉、清水孝彦、白澤卓二： β アミロイドの新しい凝集仮説. 日本農芸化学会 2003 年度大会（東京）2003 年 4 月.
7. 村上一馬、入江一浩、森本 晃、大東 肇、永尾雅哉、進藤真由美、清水孝彦、白澤卓二： β -Amyloid の新しい凝集仮説. 第 38 回天然物化学談話会（福岡）2003 年 7 月.
8. 村上一馬、入江一浩、森本 晃、大東 肇、永尾雅哉、進藤真由美、清水孝彦、白澤卓二： β アミロイドの新しい凝集モデル. 第 22 回日本痴呆学会（東京）2003 年 10 月.
9. 村上一馬、入江一浩、森本 晃、大東 肇、永尾雅哉、清水孝彦、白澤卓二：プロリン置換による A β 42 凝集体の立体構造解析. 日本農芸化学会 2004 年度大会（広島）2004 年 3 月.

(3) 出版物

な し

研究成果による工業所有権の出願・取得状況

な し

研究成果

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease: AD) は、神経変性疾患の一種であり、類似の疾患としてパーキンソン病やプリオン病などが知られている。現時点で有効な治療法はほとんどなく、本疾患の発症機構の解明ならびに根本的な治療法の確立が社会的に強く望まれている。AD 患者の脳には神経病理学上の特徴として、老人斑と神経原線維変化が認められる。老人斑は主として大脳新皮質に見られる球状の構造物であり、神経原線維変化は、海馬および大脳新皮質に出現する線維状の封入体である。老人斑は AD 患者に対する疾患特異性が高く、AD 早期から高頻度で認められることから、多くの研究者が注目してきた。

まず化学的分析により、老人斑は 40 および 42 残基のアミノ酸からなるアミロイド β ペプチド ($A\beta$) の凝集体であることが判明した¹⁾。本ペプチドの分子量は 4,500 程度と小さかったことから、前駆タンパク質の存在が予想され、アミノ酸残基数 770 のアミロイド前駆体タンパク質 (amyloid precursor protein: APP) と命名された 1 回貫通型の膜タンパク質が同定された²⁾。 $A\beta$ は、APP が細胞膜外で β -セクレターゼによって、次いで膜内で γ -セクレターゼによりそれぞれ切断されることによって産生される。しかしこの代謝系は、正常脳においても機能していることから、 $A\beta$ は APP の正常な代謝産物の一つである³⁾。 $A\beta$ は主として 40 残基の $A\beta_{40}$ 、42 残基の $A\beta_{42}$ からなるが、 γ -セクレターゼの切断位置により、39 または 43 残基のペプチドが産生される場合もある。これらの中で特に凝集能が高い $A\beta_{42}$ がまず凝集して核となり、その周りに $A\beta_{40}$ が凝集して老人斑を形成するという考え方が一般的である⁴⁾。 $A\beta$ は神経細胞死を引き起こすことから、AD の原因物質と考えられている (アミロイド仮説)。その神経細胞毒性は凝集活性と密接に関連しているが、凝集体そのものの毒性は低く、 $A\beta$ のオリゴマー構造が毒性本体であると最近では考えられている^{5,6)}。

AD には、遺伝子変異を伴わない孤発性 AD (sporadic Alzheimer's disease: SAD) と遺伝子変異を伴う家族性 AD (familial Alzheimer's disease: FAD) がある。SAD は、AD の 90% 以上を占めているが、その発症原因は多岐にわたる多因子疾患である。一方 FAD は症例が少ないが、遺伝子レベルで原因を特定しやすいことから、FAD の研究例は比較的多い。FAD 患者の遺伝子解析の結果から、APP に変異が起こることによって、AD が早期に発症することが明らかになっている²⁾。これまでに報告されている APP の変異は $A\beta_{42}$ 配列外のものと配列内のものに分類される。 $A\beta_{42}$ 配列外の変

異としては、K670N および M671L の Swedish 家系、T714I の Austrian 家系、V715M の French 家系、V715A の German 家系、I716V の Florida 家系、V717I および V717G の London 家系、V717L および V717F の Indiana 家系、L723P の Australian 家系があり、一方で A β 42 配列内の変異としては、H6R に 1 家系、D7N の Tottori 家系、A21G の Flemish 家系、E22Q の Dutch 家系、E22K の Italian 家系、E22G の Arctic 家系、D23N の Iowa 家系が知られている (図 1)。

A β 配列の外側の変異が起こっている AD 患者では、A β 産生量の増加が認められている。これは、APP の β -セクレターゼあるいは γ -セクレターゼに対する感受性が上がっているためと推定される。一方で FAD の中には、A β の凝集体が脳血管壁に異常沈着する症例がいくつか報告されており、これらは A β 配列の中心部分における変異に起因するものと考えられている。本研究では、FAD における A β 配列の変異に着目し、これらの A β 40 および A β 42 変異体を高純度で化学合成し、それらの神経細胞毒性、凝集活性ならびに 2 次構造を調べることによって、A β の凝集ならびに神経細胞毒性発現機構に関する知見を得ることを目的とした。

なお研究成果の詳細は、3 頁目記載の文献 1~3 として公表し、本冊子にもその別刷を掲載している。

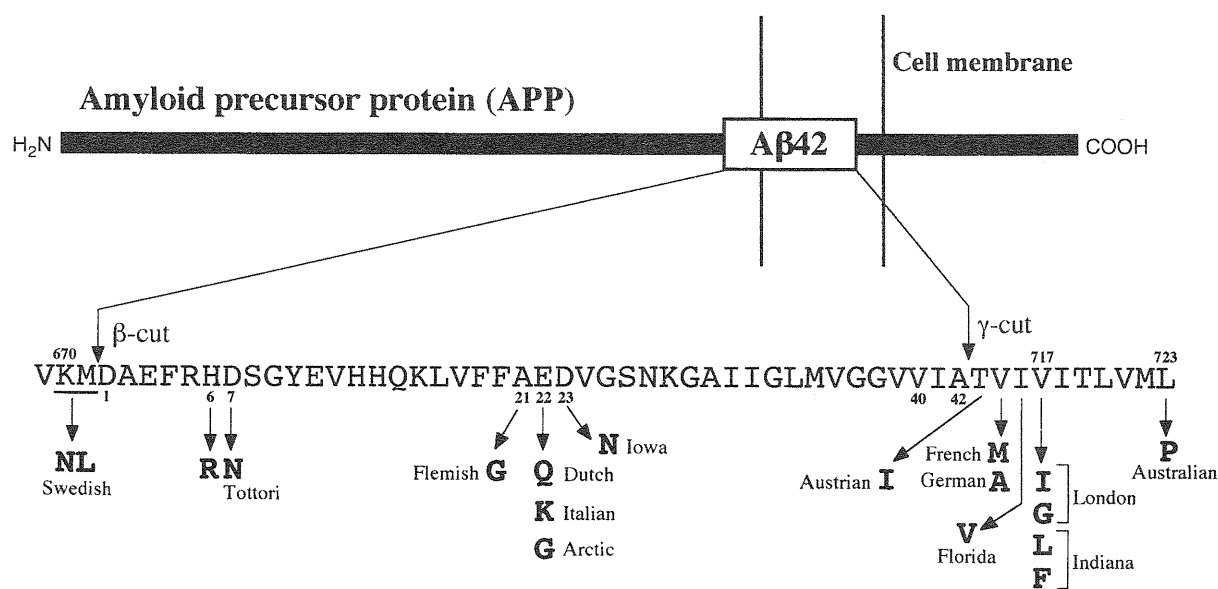


図 1 これまでに報告されている FAD における APP の変異

1. FAD 病因ペプチドの凝集活性、神経細胞毒性および2次構造解析

これまでのA β 研究のほとんどは、合成の容易なA β 40に関するものであった。しかし、A β 42の神経細胞毒性および凝集活性は、A β 40よりもはるかに高いことから、A β 42がADの発症において重要な役割を果たしているものと考えられる。しかしながらA β 42は、C末端側に嵩高い疎水性アミノ酸を連続して有するため合成難度が高く、また弱酸性条件下においても容易に凝集することから精製も困難である。そこで、ポリエチレングリコールをスペーサーとしたポリスチレン樹脂(PEG-PS)を固相担体とし、HATUを活性化剤としたFmoc法を連続フロー型合成機で行うという、A β 42の高収率合成法を確立した。さらに得られた粗ペプチドを塩基性条件下で精製することによって、A β 42を高純度で得ることができるようになった。本法を用いて、FADに見られる5種の変異型A β 40およびA β 42(A21G、E22Q、E22K、E22G、D23N)を高純度で化学合成した。

これらの変異体の神経細胞毒性を、PC12細胞を用いたMTT法によって調べたところ、22位、23位のA β 40およびA β 42変異体はいずれも野生型よりも高い毒性を示した。また、A β 42変異体の毒性は、対応するA β 40変異体と比べて50~200倍高かった。これらの結果は、A β 42変異体がFADの病因になっている可能性を示唆している。次に、各種変異体の凝集活性をHPLCを用いた遠心分離法によって調べたところ、E22G-(Arctic)およびD23N-A β 42(Iowa)の凝集活性は野生型とほぼ同程度であったが、E22K-(Italian)およびE22Q-A β 42(Dutch)は、野生型よりも激しく凝集した。本結果は、ItalianおよびDutch家系患者の脳内で、A β 凝集体の異常沈着が認められることとよく一致している^{7,8)}。さらにこれらの凝集体の電子顕微鏡撮影を行ったところ、いずれの変異体においても野生型と同様のフィブリルが観察された。以上の結果より、A β の22位および23位の変異体において、神経細胞毒性と凝集活性との間に高い相関が見られることが明らかになった。一方、A21G-A β 42(Flemish)は、野生型とほぼ同程度の神経細胞毒性を示したが、凝集能は著しく低かった。このことは、A β のフィブリル形成は、神経細胞毒性の発現において必ずしも必要ではなく、結果である可能性を示唆している。

A β が凝集するためには、特定部位において β -シート構造をとることが重要であると考えられている⁹⁾。そこでまず、フーリエ変換赤外分光法(FT-IR)によって、各種A β 42変異体の凝集前後の試料について2次構造解析を行った。その結果いずれの試料においても、凝集することによって β -シート含量が顕著に増大することが明

らかになった。

一方、高い凝集活性を示した変異体の 22 位および 23 位の配列を調べてみると、ターン構造に高頻度で見られる配列であることが判明した¹⁰⁾。そこで、ターン構造をとりやすいプロリン残基とターン構造をとりにくいバリン残基でそれぞれ 22 位を置換した A β 42 誘導体を合成した。

ターンにおいて高頻度で出現するアミノ酸残基

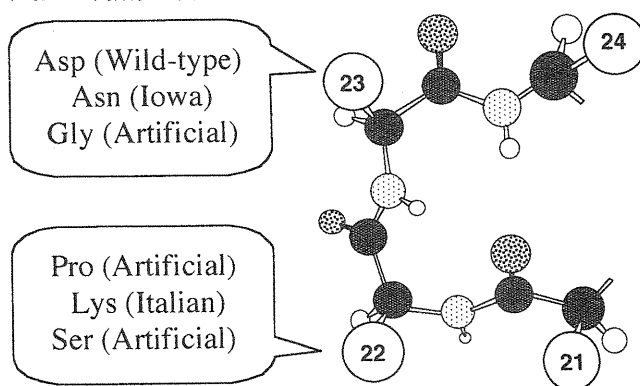


図2 A β 42 の 22 位および 23 位でのターン形成

E22P-A β 42 は、野生型に比べてはるかに高い神経細胞毒性および凝集活性を示したのに対して、E22V-A β 42 誘導体には、毒性も凝集活性もほとんど認められなかった。これより、A β 42 の凝集および神経細胞毒性の発現には分子間 β -シート形成が関与しているが、同時に 22 位および 23 位におけるターン形成も重要であることが示唆された (図 2)。A β 42 の活性発現における 22 位および 23 位のターン形成の重要性は、FAD 患者における A β の変異が 22 位および 23 位に集中していることと良く対応している。

2. プロリン置換による A β 凝集機構の解析

A β の凝集において、 β -シート構造をとる部位とターン構造をとる部位を明らかにすることは、A β の凝集機構を解明し、凝集阻害剤を開発する上で必要不可欠である。そこで、 β -シート構造をとりにくくターン構造をとりやすいプロリン残基で系統的に置換した A β 42 誘導体を高純度で化学合成し、それらの凝集活性ならびに神経細胞毒性を調べた。

1) A β 42 の中心部分の構造

FAD における A β 配列の変異が、21 位から 23 位に集中していることから、これらの部位を中心とした A β の配列が凝集において重要な役割を果たしているものと考え、15 位～32 位までを 1 残基ずつプロリンで置換した A β 42 誘導体を合成し、それらの凝集活性および神経細胞毒性を評価した (図 3)。その結果、15 位から 21 位、

および 24 位から 32 位のプロリン置換体では凝集活性ならびに神経細胞毒性ともに野生型と比べて著しく低かったことから、野生型 A β 42 はこれらの部位で β -シート構造をとっていることが強く示唆された。一方、22 位プロリン置換体は野生型 A β 42 と比べてはるかに高い凝集活性と神経細胞毒性を示した。一般にプロリン残基は、Pro-X (X: 任意のアミノ酸残基) としてターン構造を形成しやすいことから、A β 42 は、22 位および 23 位でターン構造をとっている可能性が示唆された。本結果は、高い凝集活性および神経細胞毒性を有する Italian 型変異 A β 42 において、22 位、23 位がリジン、アスパラギン酸というターン構造を取りやすい配列になっていることから支持される。

2) C 末端の構造

A β 42 は、A β 40 と比べてはるかに高い凝集活性および神経細胞毒性を有することから、C 末端の構造が凝集と毒性に密接に関連しているものと考えられる。C 末端のプロリン置換体について種々検討したところ、33 位、34 位、38 位以外のプロリン置換体の凝集活性および神経細胞毒性は、野生型 A β 42 よりも著しく低かった。特に、C 末端 2 残基のプロリン置換体はほとんど凝集せず、かつ毒性も示さなかったことから、C 末端 2 残基は β -シート形成に関与し、この β -シート構造が凝集および毒性にきわめて重要であることが示唆された (図 3)。

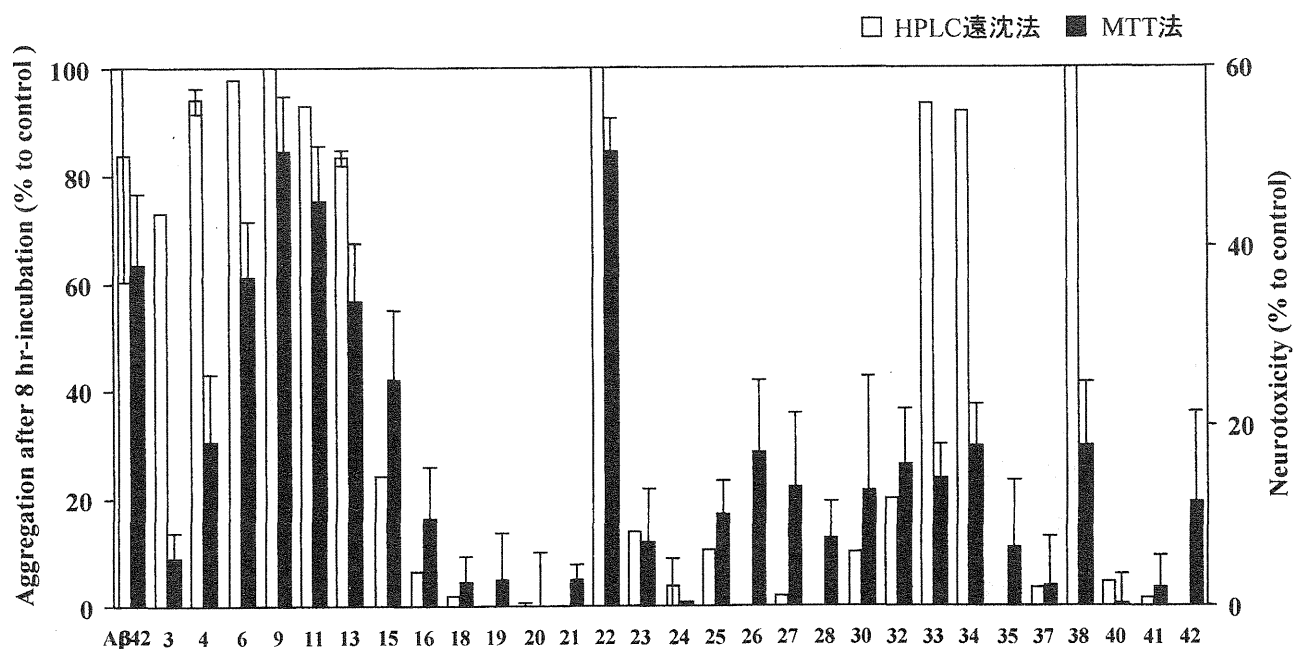


図3 プロリン置換 A β 42 の凝集活性 (HPLC による遠沈法) と神経細胞毒性 (MTT 法)

一方、33 位、34 位、38 位のプロリン置換体は野生型 A β 42 を上回る高い凝集活性を示したが、神経細胞毒性は低かった。本結果は、33 位～38 位は分子間 β -シート以外の 2 次構造をとっていること、またこれらの部位のコンホメーションが神経細胞毒性の発現において重要であることを示している。このことは、A β の毒性発現が 35 位のメチオニン残基の硫黄原子上にラジカルが生成することによってもたらされるとする Butterfield の仮説¹¹⁾と矛盾しない。

3) N 末端の構造

まず C 末端 2 残基の役割と比較するため、N 末端 2 残基を除いた A β 3-42 について検討したところ、野生型と同等の凝集活性と神経細胞毒性を示した。このことから、N 末端 2 残基は、活性に不必要であることが明らかになった。さらに、N 末端の β -シート形成への関与を調べるために、3 位～13 位までのプロリン置換体についても同様に解析を行った。その結果、すべてのプロリン置換体が野生型 A β 42 と同等かそれ以上の凝集活性ならびに神経細胞毒性を示した。従って、これらの部位は A β 凝集体において β -シート構造を形成していないものと推定される。

以上の結果より、A β 42 の凝集体においては、22 位および 23 位でターン構造を形成していること、また 15 位～21 位および 24 位～32 位が β -シート形成に関与していることが強く示唆された (図 4)。これらの β -シートは分子間平行であることが A β 40 凝集体の固体 NMR によって推定されている^{12,13)}。一方、A β 42 の C 末端数残基も β -シート構造の形成に関与していると考えられるが、これは分子内か分子間かは不明である。

ごく最近、凝集能の低い A β 40 のフィブリルの立体構造モデルが、固体 NMR による解析に基づいて提出された¹³⁾。しかし本モデルは、本研究代表者らの結果 (図 4) とは異なり、26 位および 27 位でターンを形成している。そこで E22P-A β 40 および E26P-A β 40 を化学合成し、それらの凝集能および神経細胞毒性を測定した。その結果、E22P-A β 40 は予想通り野生型 A β 40 に比べて高い細胞毒性と凝集活性を示したのに対し、E26P-A β 40 は、毒性も凝集能もほとんど示さなかった。これより、A β 40 も A β 42 と同様に、22 位および 23 位付近でターンを形成することによって凝集し、神経細胞毒性を発現している可能性が高い。ごく最近、Williams らによって A β 40 凝集体の 22 位付近でのターンを支持する結果が報告されている¹⁴⁾。

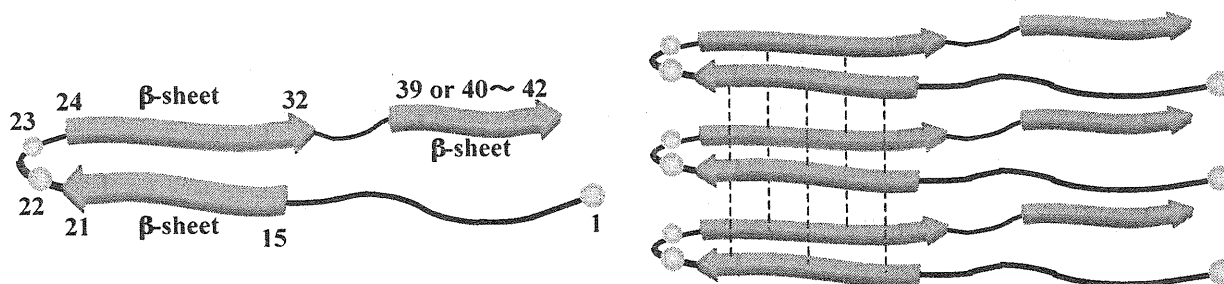


図4 Aβ42 の凝集における2次構造モデル(左)とAβ42凝集体の推定構造(右)
破線は、分子間β-シート構造を示す。なおC末端のβ-シートは分子間か分子内か明らかになっていない。

本研究の結論(図4)の真偽を確かめるためには、固体NMRによって22位付近の立体構造を精密に解析する必要がある。現在、京都大学理学研究科の竹腰助教授と共同で、Aβ42のItalian変異体の凝集体の構造解析を固体NMRによって進めている。本研究によって提出されたAβ42の凝集モデルは22位付近でターンを形成するというこれまでにない新しいものであり、今後Aβ42の凝集を阻害する化合物をデザインする上で基礎となるものである。

[文献]

- 1) Glenner, G. G. and Wong, C. W., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1984**, 120, 885-890.
- 2) Goate, A., Chartier-Harlin, M. -C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., James, L., Mant, R., Newton, P., Rooke, K., Roques, P., Talbot, C., Pericak-Vance, M., Roses, A., Williamson, R., Rossor, M., Owen, M. and Hardy, J., *Nature* **1991**, 349, 704-706.
- 3) Haass, C. and Selkoe, D. J., *Cell* **1993**, 75, 1039-1042.
- 4) Jarrett, J. T. and Lansbury, P. T. Jr., *Cell* **1993**, 73, 1055-1058.
- 5) Walsh, D. M., Klyubin, I., Fadeeva, J. V., Cullen, W. K., Anwyl, R., Wolfe, M. S., Rowan, M. J. and Selkoe, D. J., *Nature* **2002**, 416, 535-539.
- 6) Bucciantini, M., Giannoni, E., Chiti, F., Baroni, F., Formigli, L., Zurdo, J., Taddei, N., Ramponi, G., Dobson, C. M. and Stefani, M. *Nature* **2002**, 416, 507-511.
- 7) Levy, E., Carman, M. D., Fernandez-Madrid, I. J., Power, M. D., Lieberburg, I., van Duinen, S. G., Bots, G. Th. A. M., Luyendijk, W. and Frangione, B., *Science* **1990**, 248,

1124-1126.

- 8) Tagliavini, F., Rossi, G., Padovani, A., Magoni, M., Andora, G., Sgarzi, M., Bizzi, A., Savoiardo, M., Carella, F., Morbin, M., Giaccone, G. and Bugiani, O., *Alzheimer's Rep.* **1999**, 2, S28.
- 9) Teplow, D. B., *Amyloid: Int. J. Exp. Clin. Invest.* **1998**, 5, 121-142.
- 10) Chou, P. Y. and Fasman, G. D., *J. Mol. Biol.* **1977**, 115, 135-175.
- 11) Varadarajan, S., Kanski, J., Aksenova, M., Lauderback, C. and Butterfield, D. A., *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 5625-5631.
- 12) Antzutkin, O. N., Leapman, R. D., Balbach, J. J. and Tycko, R., *Biochemistry* **2002**, 41, 15436-15450.
- 13) Petkova, A. T., Ishii, Y., Balbach, J. J., Antzutkin, O. N., Leapman, R. D., Delaglio, F. and Tycko, R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 16742-16747.
- 14) Williams, A. D., Portelius, E., Kheterpal, I., Guo, J., Cook, K. D., Xu, Y. and Wetzel, R., *J. Mol. Biol.* **2004**, 335, 833-842.